

CARACTERIZACION ELECTROFONETICA DE LA VARIABILIDAD GENETICA DE  
LA RESISTENCIA DE FRIJOL COMUN A MUSTIA HILACHOSA.

Número.8Ü1-89-566 VI.

Dra. Pilar Ramírez.

Ing. Rodolfo Araya.

Biol. Sonia Rojas V.

Msc. Ana Sittenfeld.

Ing. Sandra Saborio.

Ing. Arturo Saborio. CIAT en Costa Rica.

Con un presupuesto muy limitado, este fue un proyecto introductorio que demuestra la utilidad de algunas técnicas electroforéticas como apoyo al fitomejorador y al patólogo de frijol.

.OBJETIVOS GENERALES DEL PROYECTO

Correlacionar el patrón electroforético de isoelectroenfoque y de isoenzimas de las proteínas del frijol común con la arquitectura y el grado de resistencia intermedia a Mustia Hilachosa, con el objeto de encontrar un marcador genético asociado a esas características.

Desarrollar una estructura de cooperación entre el CIAT, la Universidad de Costa Rica y el Ministerio de Agricultura, como un punto de apoyo importante en los programas de frijol de los países centroamericanos.

#### OBJETIVOS ESPECIFICOS.

Los objetivos específicos se ampliaron considerablemente a través de la investigación. Según los objetivos originales se seleccionaron 4 cultivares con características extremas en relación con su respuesta a la infección con *Mustia Hilachosa*. En estos cultivares se analizaron los patrones electroforáticos del isoelectroenfoque (IEF) de las proteínas totales de la semilla, los patrones electroforáticos de algunas isoenzimas en semillas, hojas y tallos, y los patrones electroforáticos de las proteínas totales de las hojas por SDS-PAGE.

Como ampliación del trabajo se aumento el número de cultivares de resistencia intermedia, se analizaron los patrones electroforáticos de las proteínas de almacenamiento de las semillas (Faseolinas), los patrones electroforáticos de isoelectroenfoque de variedades silvestres de frijol y se inició la caracterización molecular del ADN de algunos de los cultivares de frijol.

#### MATERIALES Y METODOS

Se emplearon cultivares de frijol tolerantes (MUS 81, TALAMANCA) y susceptibles (MUS 64, BAT 1155). Posteriormente se agregaron las siguientes 8 cultivares que también presentan cierto grado de resistencia intermedia llamados "cultivares de resistencia intermedia": MUS 37, DOR 364, XAN 226, MUS 173, XAN 176, NAG 209, M 174 y BAT 450.

## ISOELECTROENFOQUE

Se evaluaron por isoelectroenfoque los tejidos de hoja, tallo y semilla de los cultivares MUS 81, TALAMANCA, MUS 64, y BAT 1155. El tejido que dió mejores resultados fué la semilla. A una semilla de cada variedad se le quitó el pericarpo, se maceró en nitrógeno líquido y se le agregó 2 ml de agua estéril; las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 12000 rpm .

La electroforesis se hizo en un aparato Pharmacia denominado " Fast System" en mini geles con gradientes de pH de 3 a 9, de 5 a 8 y de 4 a 6,5 . El último gradiente de pH resultó ser el mejor. El gel se cargó con 1 ul de muestra, se corrió por 30 minutos a 15 grados centígrados con un total de 503 horas-voltio, posteriormente se fijaron las proteínas con ácido tricloroacético al 20 % por 30 minutos, se lavó el gel 3 veces por 10 minutos con una solución compuesta de etanol, ácido acético y agua destilada en una proporción de 3:1:6, antes de teñirlo.

Se analizaron además 16 variedades silvestres numeradas según el código de la EEFB como: 2103, 2113, 2097, 2092, 2105, 2098, 2117, 2090, 2096, PSP, 2119, 2120, 2121, 2034, 2106, Heredia centro.

## ANALISIS ELECTROFORETICO DE LAS FASEOLINAS.

Extracción de la muestra: Se tomaron dos semillas de las 8 "cultivares de resistencia intermedia" y de 2 testigos (susceptible: BAT 1155, tolerante: TALAMANCA) a las cuales se les eliminó el pericarpo y se trituraron en un mortero hasta obtener un polvo fino. Se pesaron 300 mg. y se les añadió el buffer de extracción (modificación del empleado en la unidad de Biotecnología del CIAT, 1990) en una relación de uno a dos. Posteriormente se centrifugaron los materiales a 14.000 r.p.m. a temperatura ambiente por 20 minutos. Se extrajo el sobrenadante al cual se le agregó en partes iguales el "buffer de rompimiento", se calentaron las muestras durante cinco minutos a 70 grados centígrados.

Buffer de rompimiento:

Tris Hcl 0.625 M	70 ml
Sucrosa	40 grs
Mercaptoetanol	1 ml
Azul de bromofenol	0.01 grs
SDS	2.0 gfs

De cada muestra se cargó un volumen de 10 ul en geles de 12% de acrilamida en el separador y 4% en el espaciador.

Se empleó un equipo de electroforesis Hini-Protean de la casa Bio Rad. Los geles se tiñeron con azul de comassie según el protocolo de rutina del CIBCM.

#### ANALISIS ELECTROFORETICO DE LAS PROTEINAS POR SDS-PAGE.

Se evaluaron tejidos de hoja, tallo y semilla de los 8 cultivares de resistencia intermedia con el fin de seleccionar el material óptimo para los ensayos electroforéticos en frijol. De estos tejidos la hoja resultó ser el mejor para trabajar en esta metodología, por esta razón se tomaron 10 discos de hoja con un sacabocados, por cada cultivar los cuales fueron triturados con 100 ul del buffer de extracción para proteínas (1x pH 6.8) empleado en el CIBCM de manera rutinaria. Los materiales se centrifugaron a 15,000 r.p.m. durante 30 minutos a 25 grados centígrados y en cada pozo se cargaron 10 ul de muestra. Se utilizó el mismo sistema de electroforesis y de tinción descrito para las faseolinas.

#### ANALISIS ELECTROFORETICO DE ISOENZIMAS

Esta técnica se utilizó con las dos cultivares tolerantes (TALAMANCA y MUS 81) y el susceptible (BAT .1155). Los ensayos se realizaron en geles nativos de acrilamida dada la ventajosa nitidez de este tipo de matriz, en geles de 4% de poliacrilamida en el espaciador y 7% el separador. Las electroforesis se llevaron a cabo en un mini-equipó de electroforesis de la casa Bio-Rad.

Preparación de la muestra: Se tomó 1/2 gramo de hojas

sanas de cada una de las 3 cultivares mencionadas anteriormente, se trituraron en un mortero preenfriado con 1 ml de bui'fer de extracción, según el protocolo de Rocca-Hussain - Ramírez (CIAT, 1990) . Después de centrifugar a 15,000 r.p.m. por 20 minutos a 5 grados centígrados, se cargaron 10 y 20  $\mu$ l de muestra en el gel.

**Buffer Rocca-Hussain-Ramírez:**

Tris Hcl 0,05 M pH 8.3	50 ml
Sucrosa 20 %	20 grs
PVP-40 5 %	5 grs
Tritón x-100 0,5 %	0.5 ml
2-Mercaptoetanol 14 mM	0,935ml
Agua tridestilada	100 ml

Los métodos de tinción empleados son los dados por Rocca-Hussain-Ramírez (1988) en la guía para el análisis electroforético de isoenzimas y proteínas publicado por el CIAT.

## RESULTADOS

### ARQUITECTURA DE LA PLANTA

Las plantas que mostraron resistencia intermedia y las susceptibles poseen estructura arbustiva y de guías cortas. Aunque esta arquitectura representa una ventaja para la planta

porque permite un aumento de la circulación del aire y disminuye las condiciones de humedad favorables para el desarrollo de la enfermedad, la característica de resistencia intermedia podría obedecer a otros factores.

#### ISOELECTROENFOQUE

Los resultados de isoelectroenfoque revelan que la semilla es el mejor tejido para este tipo de análisis ya que muestra nitidez de las bandas con diferencias en los patrones lo que parece ser polimorfismo que deberá ser analizado en una etapa posterior del proyecto con alguno de los programas estadísticos diseñados para este propósito. Aunque no estaba dentro de los objetivos originales efectuamos ensayos preliminares para revelar isoenzimas en este sistema de separación de proteínas según lo describe la literatura para otras plantas. Los resultados fueron negativos en frijol.

La diversidad de patrones de bandas encontrado en el análisis isoelectroforético de las proteínas de las semillas de 16 variedades de frijol silvestre\* reflejó la gran diversidad genética de este material. Esta metodología podría ser muy útil en análisis futuros.

#### ANALISIS ELECTROFORETICO DE LAS PROTEINAS TOTALES DE LAS HOJAS POR SDS-PAGE

Los patrones -e leetrof orét icos - indican que el sistema de extracción y de electroforesis fueron los adecuados, sin embargo el cotnportamiento de las muestras es desigual, algunos de los patrones son más claros que los otros. Este resultado podría reflejar diferencias reales entre los cultivares.

#### ANALISIS ELECTROFORETICO DE LAS FASEOLINAS

Los resultados obtenidos con esta técnica son satisfactorios y de buena resolución. Las fotografías de los resultados se le enviaron al Dr. Guepts junto a una solicitud de ayuda para analizar estos resultados.

#### ANALISIS ELECTROFORETICO DE ISOENZIMAS

De las cuatro enzimas ensayadas (DIA, PRX, EST, ACP) únicamente la esterasa (EST) presenta diferencias que se destaca por la presencia de una doble banda en el cultivar susceptible (BAT 1155) mientras los cultivares tolerantes (MUS 81 .y TALAMANCA) presentan una banda. Antes de considerar esta condición como un polimorfismo real entre cultivares susceptibles y tolerantes a Mustia Hilachosa es aconsejable evaluar un mayor número de cultivares susceptibles y de resistencia intermedia con el fin de confirmar si corresponde a un polimorfismo privado de BAT 1155, como también corroborar si existen otros patrones



polimórficos en las plantas de resistencia intermedia que no hayan sido observados en este experimento.

#### COOPERACION INTER-INSTITUCIONAL:

Se desarrolló una estrecha colaboración entre la Universidad de Costa Rica (CIBCM, EEFB) y el CIAT tanto con su oficina en Costa Rica como con su sede central en Cali, Colombia.

Muestra de dicha cooperación es el entrenamiento otorgado a la señorita Sonia Rojas sobre el uso de marcadores bioquímicos y moleculares ( Isoenzimas y RFPLps ) asociados a la resistencia intermedia y susceptibilidad a Mustia Hilachosa en cultivos de frijol.

También se establecieron vínculos con la Universidad de Florida mediante una visita que realizó la Dra. Pilar Ramírez al Dr. Eduardo Vallejos quien en la actualidad construye la biblioteca genética de frijol. Durante esta visita Ramírez y Vallejos discutieron los resultados preliminares sobre el aislamiento del ADN de los cultivos Mus 81, Bat 1155, Mus 64, y Talamanca.

#### CONCLUSION

Las técnicas electroforéticas de análisis de proteínas de frijol reflejan la diversidad genética entre variedades como lo

demostraron los patrones de isoelectroenfoque de variedades silvestres. La diferencia del patrón electroforético de la Esterasa entre cultivares tolerantes y susceptibles podría indicar la posibilidad de su utilización como marcador genético. No se observaron grandes diferenciales electroforéticas entre los cultivares analizados lo que refleja las genealogías de los mismos. Todos los materiales empleados como padres que han brindado progenies con resistencia intermedia para Mustia Hilachosa están dentro de la genealogía de todos los cultivares evaluados tanto susceptibles como los de resistencia intermedia.

Agradecemos al señor Bernardo Mora su colaboración para la elaboración de las genealogías.

## CARACTERIZACION ELECTROFORETICA DE LA VARIABILIDAD GENETICA DE LA TOLERANCIA DEL FRIJOL COMUN A MUSTIA HILACHOSA.

" SEGUNDO PERIODO (Marzo de '1990 a Abril de 1991) "

Dra. Pilar Ramírez, investigador líder CIBCM-UCR

Rodolfo Araya V., Mag. Se. EEFBM, UCR

Ana Sittenfeld, Mag. Se. CIBCM-UCR

Dr. Gabriel Macaya, CIBCM-UCR

Ing. Sandra Saborío S., EEFBM, UCR

Dr. Eduardo Vallejos, Universidad de Florida

Dr. Beebe, CIAT

Dr. Michael Dessert, CIAT

Dr. William Roca, CIAT

### ANTECEDENTES

Los resultados de la primera etapa nos permitieron diseñar las futuras estrategias de trabajo. Como parte de esos resultados conocemos por ejemplo: 1. Los órganos de la planta mas apropiados para los análisis electroforéticos. \*2. La cantidad de inóculo que se debe usar en los experimentos de invernadero, para que no rompa la resistencia de la planta. 3. Las condiciones de desarrollo de la planta, en las que los resultados de inoculación son semejantes a la respuesta de la planta en condiciones edafoclimáticas y ecológicas de la infección natural en el campo. 4. Las técnicas electroforéticas de análisis de proteínas que evalúan mejor la respuesta de la planta a la infección con el hongo. 5. La mejor estrategia cooperativa de investigación entre los laboratorios involucrados.

Las isoenzimas se han usado como marcadores genéticos con éxito en algunos aspectos del mejoramiento vegetal, por ejemplo como marcadores genéticos ligados a resistencia al frío (1) o resistencia a *Fusarium* (2). Desgraciadamente el número de marcadores genéticos que proveen las isoenzimas no es suficiente para un mapeo genético completo de una especie vegetal. En los últimos años los genetistas de plantas han comenzado a desarrollar mapas genéticos con el uso de RFLP (restriction fragment length polymorphism). La utilidad de los marcadores RFLP en fitomejoramiento se basa en la posibilidad de encontrar ligamiento entre esos marcadores y genes de interés (3). Hace dos años, los investigadores de CIAT y Eduardo Vallejos de la Universidad de Florida iniciaron la construcción en Phaseolus de un mapa de ligamiento entre marcadores genéticos RFLP e isoenzimas y genes de resistencia a CBB (common bacterial blight). Dentro de ese proyecto se clonaron fragmentos de ADN de Phaseolus que ahora se pueden usar como sondas genómicas (moléculas de ADN, capaces de hibridarse con moléculas complementarias) en otros proyectos de mapeo de ligamiento. Al conjunto de clones se denomina biblioteca genética de Phaseolus.

#### OBJETIVO

En la segunda etapa de este proyecto proponemos iniciar en estrecha colaboración con los grupos de Florida y CIAT, una investigación a largo plazo por etapas anuales, sobre el mapeo de ligamiento de marcadores genéticos RFLP e isóenzimas de Phaseolus con la tolerancia a Mustia.

#### RFLP:

Se llama RFLP de plantas, a la variación genética analizada como variación en el largo de fragmentos definidos de ADN, producidos por digestión del ADN de la planta con enzimas de restricción (4). Los fragmentos de ADN se separan de acuerdo a su

largo por electroforesis y luego se transfieren a una hoja de nitrocelulosa o nylon. Después de incubar la nitrocelulosa con una sonda marcada con radiactividad o con enzimas, los fragmentos de ADN presentes en la nitrocelulosa que hibridan con la sonda son visualizados como bandas. Cada planta tiene un patrón de hibridación específico que se puede usar como marcador genético de alguna característica de la variedad, por ejemplo, resistencia a una enfermedad. El "Polimorfismo del largo de los fragmentos de ADN producidos por enzimas de restricción", RFLP en inglés, mide la coincidencia entre bandas dentro del total de bandas presentes entre las muestras analizadas. En tomate se han identificado marcadores RFLP e isoenzimas ligados a genes de resistencia al virus del mosaico del tabaco (5) y Fusarium (6). En maíz y lechuga respectivamente se ha establecido ligamiento entre marcadores RFLP y genes para la resistencia al dwarf mosaic virus (3) y el "downy mildew" (7).

#### OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Desarrollar las técnicas electroforáticas de análisis de ADN de Phaseolus en agarosa y poliacrilamida con tinsiones de bromuro de etidio y plata.
2. Desarrollar la técnica de Southern, es decir la transferencia de moléculas de ADN de los genes de análisis a membranas de nitrocelulosa o de nylon.
3. Transferir el CIBCM, parte de la biblioteca genética de Phaseolus construida por el Dr. Vallejos.
4. Marcar las moléculas de ADN de Phaseolus (sondas) de manera no radiactiva. Comparar la sensibilidad de detección con los resultados obtenidos por Vallejos usando fósforo radioactivo.

5. Analizar las variedades de frijol ya conocidas por isoenzimas con la técnica de RFLP utilizando algunas sondas dependiendo del presupuesto. Se evaluarán mas sondas y mas variedades de frijol en la etapa siguiente del proyecto.

#### PRESUPUESTO

La Universidad de Costa Rica aporta el 90% de los costos; como salario de los investigadores, salario de los asistentes, equipo de aislamiento de macromoléculas, ultracentrifugación y facilidades para la ingeniería genética, servicios administrativos invernaderos y campo experimental.

El Programa Cooperativo de Frijol de Centroame'rica, México y el Caribe, aportará el 10% restante equivalente a \$ 10,000, que se invertirán en medios de cultivo, reactivos para ingeniería genética, electroforesis e insumos para el desarrollo y protección de plantas. También se mejorarán las facilidades del laboratorio de la Estación Experimental Fabio Baudrit, para trabajar con el patógeno; con la adquisición de algún equipo y cristalería.

#### LITERATURA CITADA

1. VALLEJOS, C.E.J TANKSLEY, S.D. 1983. Segregation of isozyme markers and cold tolerance in an interspecific backcross of tomato. Theor. Appl. Genet. 66: 241-247.
2. BOURNIVAL: B.L ; SCOTT, J.W.j VALLEJOS, C.E. 1989 . An isozyme marker for resistance to race 3 of Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici in tomato. Theor. Appl. Genet. 78.
3. TANKSLEY, S.D.; YOUNG, N.D.; PATERSON, A.H.;, BONIERBALE, M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old Science. Biotechnology 7: 257-264.

4. BECKMANN, J.S.; SOLLER, M. 1986. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica* 35: 111-124.
5. YOUNG, N.D.; ZAMIR, D.; GANAL, M.W.; TANKSLEY, S.D. 1988. Use of isogenic lines and\* simultaneous probes to identify DNA markers tightly linked to the Tm-2a gene in tomato. *Genetics* 120: 579-585.
6. PATERSON, A.H.; LANDER, E.S.; HEWITT, J.D.; PETERSON, S.; LINCLOLN, S.E.; TANKSLEY, S.D. 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete RFLP linkage map. *Nature* 335: 721-726.
7. LANDRY, B.S.; KESSELI, R.V.; FARRARA, B.; MICHELMORE, R.W. 1987. A genetic map of lettuce (Lactuca sativa L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological marker. *Genetics* 116: 331-337.